

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Aleksandr Bregin

**LSAMP geeni puudulikkusest põhjustatud ülitundlikkus
bensodiasepiinidele ja etanoolile hiirtel**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Jürgen Innos

PhD Mari-Anne Philips

PhD Kersti Lilleväli

TARTU 2014

Sisukord

| | |
|---|----|
| Kasutatud lühendid..... | 4 |
| Sissejuhatus | 6 |
| 1 Kirjanduse ülevaade | 7 |
| 1.1 GABAergiline süsteem | 7 |
| 1.1.1 GABA | 7 |
| 1.1.2 GABA _A -retseptorid..... | 7 |
| 1.2 Bensodiasepiinid | 9 |
| 1.2.1 Bensodiasepiinide üldine farmakoloogia..... | 9 |
| 1.2.2 Bensodiasepiinid meditsiinis ja nende kuritarvitamine | 10 |
| 1.2.3 Bensodiasepiinidest põhjustatud sõltuvuse molekulaarsed mehhanismid | 10 |
| 1.3 Etanool | 13 |
| 1.3.1 Etanooli üldine farmakokineetika..... | 13 |
| 1.3.2 Etanooli üldine farmakoloogia..... | 14 |
| 1.3.3 Etanool ja GABA _A -retseptorid | 15 |
| 1.4 IgLON-valkude perekond | 16 |
| 1.4.1 LSAMP | 17 |
| 1.4.2 LSAMP-puudulikud hiireliinid..... | 17 |
| 2 Eksperimentaalosa..... | 19 |
| 2.1 Töö eesmärgid | 19 |
| 2.2 Materjalid ja meetodid | 19 |
| 2.2.1 Katseloomad | 19 |
| 2.2.2 Käitumiskatsed..... | 19 |
| 2.2.2.1 Tõstetud pluss-puur | 20 |
| 2.2.2.2 Püstumisrefleksi kadumine ja taastumine | 20 |
| 2.2.2.3 Liikumisaktiivsuse katse | 21 |
| 2.2.3 Ainete manustamine..... | 21 |
| 2.2.4 Statistiline analüüs | 21 |
| 2.3 Tulemused | 22 |
| 2.3.1 Katsed diasepaamiga..... | 22 |
| 2.3.2 Katsed alprasolaamiga | 23 |
| 2.3.3 Katsed etanooliga..... | 24 |

| | |
|--------------------------|----|
| 2.4 Arutelu..... | 26 |
| Kokkuvõte | 29 |
| SUMMARY | 31 |
| Kasutatud kirjandus..... | 34 |
| Tänuavaldused..... | 40 |
| Lihtlitsents | 41 |

Kasutatud lühendid

AC7 – adenülaadi tsüklaas 7 (*adenylylcyclase 7*)

ADH – alkoholi dehüdrogenaas (*alcohol dehydrogenase*)

ALDH – aldehüüdi dehüdrogenaas (*aldehyde dehydrogenase*)

cAMP – tsükliline adenosiin-monofosfaat (*cyclic adenosin-monophosphate*)

CB1R – esimest tüüpi kannabinoidretseptor (*cannabinoid receptor type-1*)

DA – dopamiin

FAS – fetaalne alkoholisündroom (*fetal alcohol syndrome*)

GABA - γ -aminobutüürhape (*γ -aminobutyric acid*)

Gly – glütsiin (*glycine*)

GPI – glükosüül-fosfatidüülinositol (*glycosyl-phosphatidylinositol*)

H101 – histidiin positsioonis 101

HNT – inimese neurotrimiin (*human neurotrimin*)

IgLON – immuunoglobuliin LON

kDa – kilodalton

LSAMP – limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (*limbic system-associated membrane protein*)

LORR – püstumisrefleksi kadumine (*loss of righting reflex*)

lsamp – LSAMP-valgu geen

Mbp – megaluspaar (*megabasepair*)

NAc – naalduv tuum (*nucleus accumbens*)

LacZ-NEO – beeta-galaktosidaasi ja neomütsiini fuseeritud geen

NEGR-1 – neuronaalne kasvufaktor-1 (*neuronal growth factor-1*)

Ntm – neurotrimiin hiires

ntm – neurotrimiini geen

OBCAM – opioide siduv raku adhesioonimolekul (*opioid-binding cell adhesion molecule*)

pA – pikoamper

PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas (*cAMP-dependent protein kinase*)

PKC – proteiinkinaas C (*protein kinase C*)

RORR – püstumisrefleksi taastumine (*regain of righting reflex*)

Src – türosiinkinaas (*tyrosine-kinase*)

VTA – ventraalne katendiala (*ventral tegmental area*)

Sissejuhatus

Üks suuremaid terviseprobleeme tänapäeva maailmas on stress ning sellest tingitud ärevus, depressioon ja elustiili muutused. Tihtipeale hakatakse kasutama alkohoolseid jooke, et probleeme tagaplaanile lükata, ohustades sellega enda ja lähedaste tervist. Harvemini otsitakse abi arsti juures, kes võib pakkuda erinevaid lahendusi – antidepressante, ärevusvastaseid ravimeid või raskemate juhtumite korral ka kompleksset psühhiaatrilist ravi. Ärevusvastaste ravimitena on enamasti kasutusel bensodiasepiinid, mis on maailmas kuritarvitatavatatest retseptiravimitest teisel kohal. Nii bensodiasepiinid kui ka etanool võivad kergesti põhjustada sõltuvust.

Sõltuvuse molekulaarsetest mehhanismidest on vähe teada. Bensodiasepiinidest põhjustatud sõltuvuse uuringud näitavad, et olulised on GABA_A-retseptori ehk γ -aminobutüürhappe_A-retseptori kindlad (α 1-subühikut sisaldavad) alatüübid ning nende seos kindlates ajupiirkondades asuvate dopamiinergiliste neuronitega (Tan jt., 2011).

Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk ehk LSAMP (ingl. k – limbic system-associated membrane protein) on aju-spetsiifiline rakk-rakk adhesioonimolekul, mille üheks põhiliseks ülesandeks on neuriitide väljakasvu suunamine. LSAMP-puudulike hiirte uuringud on näidanud, et need loomad on muudetud ärevus- ja sotsiaalse käitumisega (Innos jt., 2012; 2013). Samuti on LSAMP-puudulikes hiirtes hälved GABA_A-retseptorite α 1 ja α 2 subühikute paiknemises ja kontsentratsioonis (Innos jt., 2011).

Käesolev töö seob bensodiasepiinidest ja etanoolist tekkiva fenotüübilise disinhibitsiooni LSAMP-puudulike hiirte käitumuslike eripäradega ning uurib nende loomade tundlikkust etanooli ja kahe populaarsema bensodiasepiini (diazepaam ehk Valium ja alprasolaam ehk Xanax) teatavate toimete suhtes.

Töö esimeses osas esitan kirjanduse ülevaate, mis on oluline tulemustest arusaamiseks. Kirjutan GABAergilisest süsteemist, bensodiasepiinide ja etanooli üldisest neurofarmakoloogiast, LSAMP-valgust ja LSAMP-puudulikest hiirtest. Töö eksperimentaalse ülesandeks oli mõõta LSAMP-puudulike hiirte tundlikkust diazepaami, alprasolaami ja etanooli erinevatele toimetele ning viia läbi tulemuste statistiline analüüs.

Käesolev töö koostati Tartu Ülikooli SiirdemeditSiini Tippkeskuses.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 GABAergiline süsteem

GABAergiline süsteem on GABA-st ja GABAergilistest (ehk GABA vabastavatest) neuronitest koosnev inhibitoorne süsteem imetajate ajus. Aktiveerivaks süsteemiks on näiteks dopamiinergiline, mille koosseisus on dopamiin ja selle vabastavad neuronid. Käesolevas töös keskendutakse GABAergilisele süsteemile.

1.1.1 GABA

GABA on põhiline inhibitoorne neuromediaator imetajate ajus. Selle kontsentratsioon on eriti suur nigrostriiaalses süsteemis (ca 10 $\mu\text{mol/g}$), kuid teistes ajupiirkondades on seda samuti palju (2-5 $\mu\text{mol/g}$) (Dale ja Rang, 2007). GABA sünteesitakse glutamaadi dekarboksülaasi poolt glutamaadist ainult GABAergilistes neuronites. GABA kontsentratsiooni vähenemine ajus võib viia konvulsioonide ehk krampideni (Meyer ja Quenzer, 2005), mis viitab aine tähtsale rollileaju erutuvuse taseme reguleerimises (Treiman, 2001).

GABA kontsentratsiooni regulatsioon on oluline epilepsiahoogude ärahoidmisel. Üks meetod selleks on GABA transporter-1 inhibeerimine. See valk mängib olulist rolli GABA vabastamisel ja transpordil sünap sis. Samuti oluline ensüüm on GABA-transaminaas, mis katalüüsib GABA ja 2-oksooglutaraadi sünteesi suksinaadiks ja glutamaadiks. Selle ensüümi pöördumatu inhibiitor on vigabatriin, mida kasutatakse mõnede epilepsia tüüpide raviks (Meyer ja Quenzer, 2005).

Ühed kliinilises mõttes populaarsemad GABAergilise süsteemi regulatoorsed farmakonid on bensodiasepiinid.

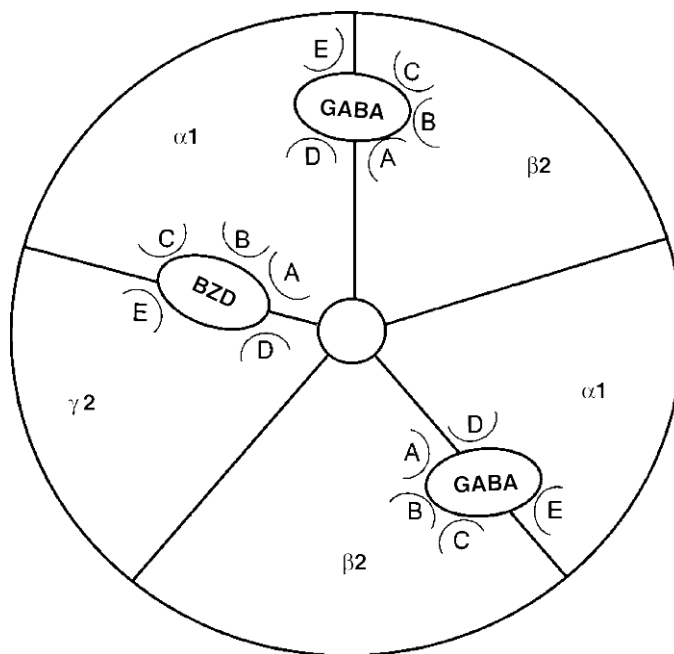
1.1.2 GABA_A-retseptorid

GABA_A-retseptorid on keerulise struktuuriga transmembraansed heteropentameerid, mille molekulaarmass on ca 275 kilodaltonit (kDa). Kogu retseptorkompleks moodustab Cl⁻-ioonkanali, mis kindlate ainete seondumisel reguleerib kloori liikumist neuronitesse (Feldman jt., 1996).

Organismisisestest ainetest on GABA_A-retseptori põhiliseks agonistiks GABA, mis tähendab et GABA_A-retseptori positiivne aktivatsioon inhibeerib vastavaid neuroneid, sest imetajate organismides on GABA inhibitoorne neuromediaator.

GABA_A-retseptorite subühikutel võivad olla erinevad isovormid: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , π , ρ (1-3) ja θ , kuid kõige levinum on järgmistest subühikutest koosnev pentameer: üks α , kaks β -d ja kaks γ -d (Makkar jt., 2010). Nii retseptorite (ehk nende koosseisu kuuluvate subühikute) kui ka nende paiknemise heterogeensus on suur, mis võib viidata subühikulise koostise sõltuvusele neuronitüübist (Feldman jt., 1996).

GABA_A-retseptorid kuuluvad cys-loop tüüpi retseptorite (N-atsetüülkoliini ehk nACh-retseptor, GABA_A-retseptor, glütsiini ehk Gly-retseptor jt.) hulka. Cys-loop tüüpi retseptor on pentameerne molekul, mille keskel on ioonkanal. Sellist tüüpi retseptorites on kõrge seondumiskohtade homoloogsus, mistõttu GABA_A-retseptorite seondumiskohtade paiknemist on võimalik oletatada nACh-retseptorite põhjal (vt. joonis 1) (Olsen jt., 2004).



Joonis 1. Skemaatiline mudel GABA_A-retseptorist koos GABA ja bensodiasepiinide (BZD) sidumissaitidega. A-E – proteiini interaktsiooniahelad (Olsen jt., 2004).

GABA_A-retseptorite juures on oluline fosforüleerimine. cAMP-sõltuv proteiinkinaas (ehk PKA), proteiinkinaas C (ehk PKC) ning türosiinkinaas Src fosforüleerivad kindlaid aminohappejääke, eriti valgu intratsellulaarses piirkonnas β 1-3 ning γ 2 subühikutes

(Kittler ja Moss, 2003). Fosforüleerimine tagab GABA_A-retseptoritele plastilisuse, funktsioonide mitmekesisuse ning retseptorite paiknemiskontsentratsioonide erinevuse postsünaptilistes membraanides (Mody ja Pearce, 2004).

1.2 Bensodiasepiinid

Bensodiasepiinid on psühhoaktiivsed ained, mille esindajad seonduvad üle kogu aju asuvate GABA_A-retseptoritega, reguleerides sellega afiinsust GABA vastu (Coulson, 1994).

1.2.1 Bensodiasepiinide üldine farmakoloogia

Bensodiasepiinide põhisihthmärk on GABA_A-retseptorid ning nende ühendite toime põhimõte on GABA afiinsuse muutmine. Agonistid (nt. diasepaam ja alprasolaam) suurendavad afiinsust, antagonistid (nt. flumaseeniil) vähendavad. Üksikkanali vaatlused näitavad, et bensodiasepiinide toimel muutub ainult kanali avamise sagedus, kuid mitte läbilaskvus või lahtioleku kestus. See tähendab, et GABA_A-retseptorite kanalid lasevad ikka sama palju ioone läbi ning nad ei ole pikemat või lühemat aega lahti, kuid kanal avaneb sagedamini (Dale ja Rang, 2007).

Bensodiasepiinid seonduvad ainult nendele GABA_A-retseptoritele, kus on olemas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ või $\alpha 5$, β (enamasti $\beta 2$ või $\beta 3$) ning peaaegu alati $\gamma 2$ subühikud. Nende vastav stöhhioomeetria peab olema 2:2:1 (Rudolph ja Möhler, 2006). Rudolph ja Möhler (2004) näitasid samuti, et α subühikute teatavates positsioonides (nt. H101 $\alpha 1$ ja $\alpha 2$ puhul) tekitatud punktmutatsioon hiirtel vähendab diasepaami mõju motoorsele aktiivsusele. Senised andmed viitavad, et bensodiasepiinide erinevaid toimeid vahendavad erinevad subühikud. Seega, kui teha kindlaks, millised subühikud vastutavad millise bensodiasepiinide toime eest, oleks võimalik disainida vastavate subühikute agoniste/antagoniste/pöördagoniste, mille farmakoloogiline mõju oleks kitsam ja paremini kontrollitav. Sellesuunalises teadustöös on juba mõningat edu saavutatud (Tan jt., 2011).

On samuti näidatud, et bensodiasepiinide toime avaldumiseks on oluline mitte ainult GABAergiline süsteem, vaid ka selle süsteemi interaktsioon endokannabinoidsüsteemiga. García-Gutiérrez ja Manzanares (2010) näitasid, et bensodiasepiinide anksiolüütilise, sedatiivse ja amnestilise toime avaldumiseks on vajalik toimiv esimest tüüpi kannabinoidretseptor (CB1R), mis on endokannabinoidsüsteemi üks

põhikomponente. Täpsemalt, alprasolaami toime oli CB1R antagonisti AM251 olemasolul blokeeritud, samuti ei olnud alprasolaamil efekti CB1R-puudulikel hiirtel. Täpne molekulaarne mehhanism selle interaktsiooni taga on veel teadmata.

1.2.2 Bensodiasepiinid meditsiinis ja nende kuritarvitamine

Meditsiinis on bensodiasepiinid kasutusel unetuse, ärevus- ja paanikahäirete, alkoholisõltuvuse ja krampide ravis (Dale ja Rang, 2007). Nende kasutamine, sõltuvalt ravimist ja patsiendi tüübist, peaks kestma mõnest päevast kuni nelja nädalani (Ashton, 1994). Selle aja ületamisel võib patsiendil suure tõenäosusega tekkida tolerantsus, millele järgnevad sõltuvus ja võõrutusnähud. Näiteks diasepaami puhul ilmnevad võõrutusnähud kui päevane ravimi doos ületab 80-120 mg ja ravimit tarvitatakse 40-50 päeva järjest (Skoutakis ja Vasilios, 1982). Samas on näidatud, et kõikidel ei teki sõltuvust. Bensodiasepiinide väljakirjutamisel on oluline jälgida, kas patsiendil esineb meeleoluhäireid (nt. bipolaarne häire) ning kas need võivad soodustada bensodiasepiinide kuritarvitamist (Tyrer, 1989). Kuna bensodiasepiinid imenduvad soolestikus võrreldes teiste ravimitega aktiivsemalt ning läbivad ka hematoentsefaalbarjääri suhteliselt kergesti, hakkavad need ained mõjuma kiiresti (Schatzberg ja Nemeroff, 2004). See on üks põhjustest, miks bensodiasepiinid tekitavad sõltuvust nii kergesti.

1.2.3 Bensodiasepiinidest põhjustatud sõltuvuse molekulaarsed mehhanismid

Bensodiasepiinid on koos opiaatidega kõige sagedamini kuritarvitatavad ravimid (<http://nida.nih.gov>). Sõltuvuse molekulaarsed mehhanismid on väga erinevad, kuid on näidatud, et kõik sõltuvusttekitavad ained ja ka naturaalsed sarrustused suurendavad dopamiini (DA) kontsentratsiooni mesolimbilises DA süsteemis (Schultz, 2010).

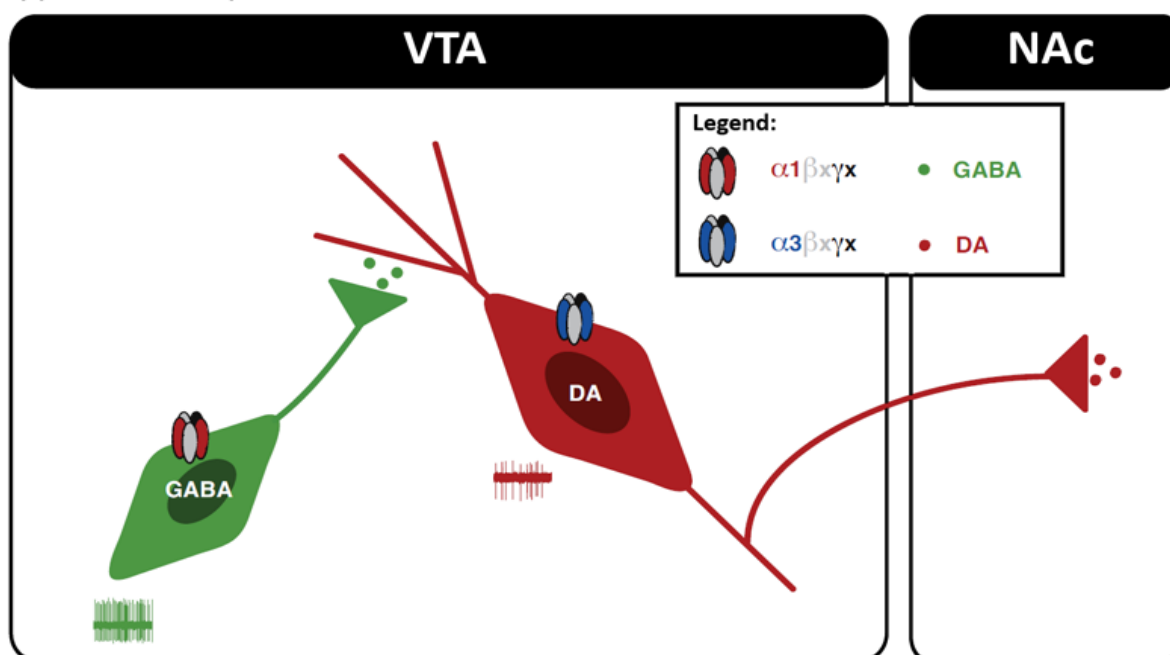
DA neuronid aktiveeruvad ootamatu sarrustuse korral. Kui sarrustus muutub ennustatavaks, nihkub DA neuronite aktivatsioon vastuselt sarrustusele seda põhjustava signaalile. See tähendab, et signaali olemasolul, kuid sarrustuse puudumisel, toimub DA neuronite inhibitsioon (Schultz, 2010).

Kirjeldatud mehhanisme on võimalik rakendada ka bensodiasepiinidest põhjustatud sõltuvusele (vt. joonis 2).

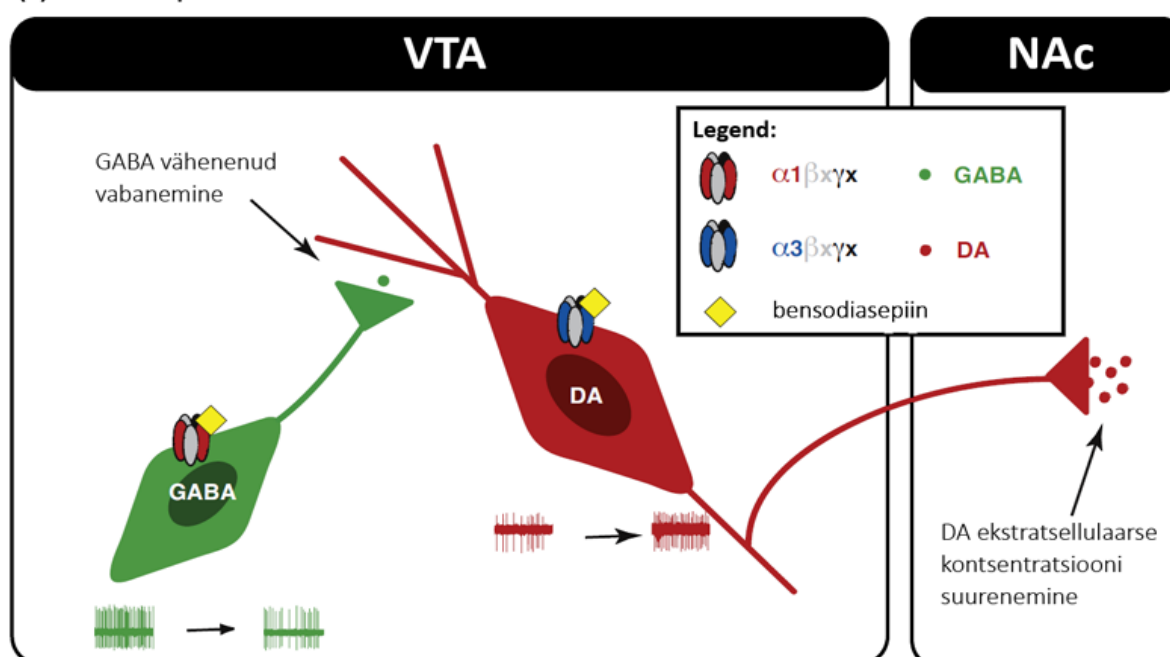
Mesolimbiline DA süsteem saab alguse ventraalsest katendialast (ingl. k – ventral tegmental area, VTA), mida nimetatakse ka sarrustuse keskuseks. VTA koosneb põhiliselt GABA-interneuronitest ja dopamiinergilistest neuronitest. Dopamiinergilised neuronid saavad kohalike inhibitoorseid signaale GABA interneuronitelt ning edastavad neid ventraalsesse juttkehasesse, täpsemalt naalduvasse tuuma (*nucleus accumbens* - NAc) (Tan jt., 2011). Kuigi GABA_A-retseptorid on olemas nii GABA- kui ka dopamiinergiliste neuronite membraanides, ei ole nad ühesugused – GABA interneuronites paiknevad GABA_A-retseptorid sisaldavad enamasti $\alpha 1$ -subühikuid, dopamiinergilistes neuronites paiknevad GABA_A-retseptorid $\alpha 3$ -subühikuid. On näidatud, et $\alpha 1$ subühikud on olulised bensodiasepiinide sõltuvust tekitavas toimes (Tan jt., 2010).

Kui bensodiasepiinid seonduvad GABA interneuronite pinnal olevate GABA_A-retseptoritega, väheneb nendest vabaneva GABA hulk, mistõttu loomulik ainete metabolism on häiritud. GABA kontrollib DA vabanemist dopamiinergilistest neuronitest ning GABA kontsentratsiooni vähenemisel suureneb NAc-i vabanev DA hulk (Tan jt., 2011). On näidatud, et DA kontsentratsioon NAc-i tuumas on põhifaktor, mis motiveerib käitumise muutmist teatud eesmärkide saavutamisel (Phillips jt., 2007).

(a) Ilma bensodiasepiinideta



(b) Bensodiasepiinide olemasolul



Joonis 2. Oletatav bensodiasepiinidest tekkiva sõltuvuse molekulaarne mehhanism. a) Bensodiasepiinide puudumisel on GABA interneuronist vabanev GABA hulk piisavalt suur, et inhibeerida dopamiinergilist neuronit ning vältida liigset DA vabanemist NAc-i. b) Bensodiasepiinide olemasolul on GABA vabanemine interneuronist allareguleeritud, mistõttu dopamiinergilise neuronit inhibeerimist ei toimu ning NAc-i (ja ka teistesse VTA sihtkohtadesse) vabanev DA hulk on suur (Tan jt., 2011 järgi).

Kokaiinist ja opiididest tingitud DA kontsentratsiooni muutused NAc-is mängivad suurt rolli sõltuvuse tekkes, kuid bensodiasepiinidest tingitud sõltuvuse kohta täpsed andmed veel puuduvad (Tan jt., 2011).

Samuti on näidatud, et sõltuvust tekitavad ained, nt. kokaiin ja opiaadid, indutseerivad sünaptilist plastilisust aju sarrustuskeskuses (Russo jt., 2010). Sünaptiline plastilisus tähendab selles kontekstis neuronite struktuurset plastilisust – sõltuvust tekitavate ainete kasutamine muudab dendriitsete jätkete (ingl. k – dendritic spines) suurust ja komplekssust (Robinson ja Kolb, 2004). Näiteks kokaiin suurendab nende hulka ja keerukust (Robinson ja Kolb, 2004), aga opiaadid vähendavad (Sklair-Tavron jt., 1996).

1.3 Etanool

Etanool on alkohol, mille keemiline valem on $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$.

Etanool koos nikotiini ja kofeiiniga on kõige populaarsemad sotsiaalselt aktsepteeritud psühhoaktiivsed narkootilised ained (Salaspuro jt., 1998).

Etanooli lühiajaline tarvitamine põhjustab intoksikatsiooni ja dehüdratsiooni. Pikaajalised efektid on muutused maksa- ja ajumetabolismis ning alkoholism ehk alkoholisõltuvus. Käitumuslikul tasandil võib etanool põhjustada kohmakust, reflekside aeglustumist ja agressiivsust (Meyer ja Quenzer, 2005). Samuti stimuleerib etanool insuliini tootmist, mis kiirendab glükoosi metabolismi. See on eriti ohtlik diabeeti põdevatele inimestele (Shelmet jt., 1988). Tervetes inimestes võib glükoosi taseme langus olla põhjuseks agressiivsusele.

Pikaajaline tarvitamine põhjustab maksatsirroosi, ajukahjustusi, muutusi kardiovaskulaarses süsteemis jpm. Etanooli kontsentratsioon $5+ \text{ g/l}$ veres on suure tõenäosusega surmav, kuigi on täheldatud juhtumeid, kus inimesed on jäänud ellu verealkoholi kontsentratsiooniga, mis ületas 12 g/l (Vonghia jt., 2008).

1.3.1 Etanooli üldine farmakokineetika

Kuigi etanool on väike ja lihtne molekul, on selle lahustuvus vees väga hea, mistõttu imendub see soolestikust kiiresti ning liigub verre. Kõrge alkoholisisaldusega joogi kiire tarbimine viib kiiremini joobeseisundini, kuid toid nii maos kui ka seedetraktis aeglustab imendumisprotsessi (Meyer ja Quenzer, 2005). Naistel on etanooli metabolism aeglasem –

selle põhjuseks on alkoholi dehüdrogenaasi (ADH) madalam aktiivsus gastrointestinaaltraktis (Baraona jt., 2001).

Verega liigub etanool üle terve keha ning difundeerub kõikidesse kudedesse ja organitesse. Samuti läbib aine platsentat ning raseduse ajal siseneb ka loote kudedesse, millega võib põhjustada fetaalset alkoholisündroomi (FAS). Selle sündroomiga lastel on iseäralikud fenotüübilised muutused, nt. väiksem pea, väike ala ninasõõrmete vahel, peenem ülahuul jm. Sarnaseid muutusi on täheldatud ka FAS-i mudeli hiireembrüotes (O'Leary-Moore, 2011). Täiskasvanud ja noorukieas olevad inimesed, kes on sündinud FAS-iga, on keskmisest väiksemat kasvu, väiksema peaga ja madalama IQ-ga. Neil on kehvem arvutus-, hindamis- ning sotsialiseerumisevõime (Streissguth jt., 1991).

Etanooli lammutamise esimene etapp toimub maksas – seda teostab ADH. Etanooli oksüdeerimise tagajärjel tekib toksiline atseetaldehüüd, mille atseetaldehüüdi dehüdrogenaas (ALDH) peab kiiresti oksüdeerima. Selle ensüümi geneetilised variatsioonid määravad ära inimeste etanoolitaluvuse. Ensüümi aktiivse vormi homosügootid suudavad oksüdeerida atseetaldehüüdi kõige kiiremini, heterosügootid aeglasemalt ning inaktiivse vormi homosügootide ALDH aktiivsus on kõige madalam (Meyer ja Quenzer, 2005). See tähendab, et mida aeglasem on atseetaldehüüdi metabolism, seda rohkem ta organismis kuhjub, põhjustades intoksikatsiooni. Aasia populatsioonis on rohkem levinud alleelide inaktiivsed vormid (Shen jt., 1997), mistõttu on seal alkoholismi probleem väiksem (Peng jt., 1999).

1.3.2 Etanooli üldine farmakoloogia

Etanoolil on palju erinevaid molekulaarseid sihtmärke, aga nendest on suhteliselt vähe teada. Etanool mõjutab nii ensüümide funktsioone, neurotransmitterite vabanemist kui ka ionkanalite läbilaskvust. Etanooli sihtmärkide täpne nimekiri puudub, sest raske on eristada kaudset ja otsest mõju (Harris jt., 2008). On teada üle saja transgeense hiireliini, milles etanooli mõju on võrreldes metsiktüüpi hiirtega erinev (Crabbe jt., 2006). Ent see ei tähenda, et kõik nende geenide produktid seonduvad etanooliga – mõju võib olla ka kaudne. Näiteks mõne valguga seonduv võib etanooli interaktsioonivõime teiste molekulidega muutuda. See on üks võimalustest, kuidas etanool saab toimida kaudselt.

Vaid üksikute molekulide interaktsioonid etanooliga on teaduslikult tõestatud. Need on ensüümidest ADH ja teatud adenülaadi tsüklaasi isomeerid (AC7 on neist kõige

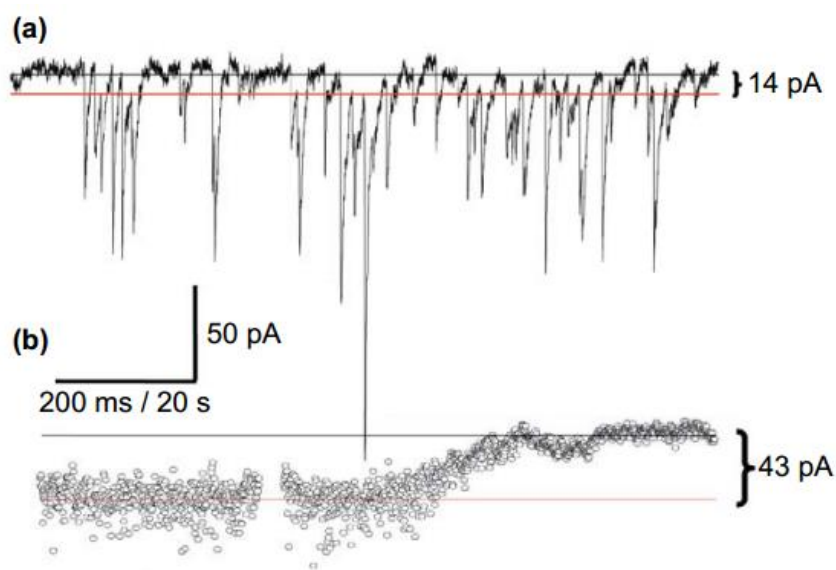
tundlikum),ioonkanalitest põhiliselt cys-loop tüüpi retseptorid (Olsen jt., 2014; Harris jt., 2008; Yoshimura ja Tabakoff, 2006). Käesolevas töös käsitlen lähemalt etanooli interaktsioone GABA_A-retseptoritega.

1.3.3 Etanool ja GABA_A-retseptorid

Etanooli seondumiseks ja selle mõju avaldumiseks on vaja mitmeid faktoreid. Kõigepealt peab sidumistasku olema piisava suurusega, sidumiskoha afiinsus etanoolile suhteliselt suur ning sidumine peab muutma ka valgufunktsiooni (Olsen jt., 2014).

Kõrgematel kontsentratsioonidel (>100 mM) seondub etanool väga paljudele GABA_A-retseptori tüüpidele. Madalamatel, sotsiaalse tarbimisega võrreldavatel kontsentratsioonidel (<30 mM) etanool kõige levinumatele GABA_A-retseptoritele ei seondu (Wallner jt., 2006).

Samas on leitud, et veel madalamatel etanooli kontsentratsioonidel (ca 3 mM) on kaks kindlat GABA_A-retseptorite tüüpi etanoolile väga tundlikud: $\alpha 4\beta 3\delta$ ning $\alpha 6\beta 3\delta$, kusjuures suurt rolli mängivad siin $\beta 3$ subühikud (Wallner jt., 2003). On oluline, et kõik δ -subühikuid sisaldavad GABA_A-retseptorid paiknevad enamasti ekstrasünaptiliselt, ehk sünapstest väljaspool, ning nende afiinsus GABA suhtes on palju madalam. Nende aktivatsioon ei ole tavaline – see on tooniline, mis kompenseerib madalat afiinsust GABA suhtes. Tavaline, ehk faasiline aktivatsioon on levinum ja kiirem ning toimub pursetena. Tooniline aktivatsioon on harvem ning vastutab „aeglase“ signaaliedastuse eest (Semyanov jt., 2004). Seda tüüpi retseptorid on pikemat aega lahti ning neid läbiv ionide vool on palju suurem kui faasilise aktivatsiooniga GABA_A-retseptoritel (vt. joonis 3).



Joonis 3. Faasilise ja toonilise ionide liikumise võrdlus. a) Levinum faasiline ionide liikumine. Punane joon – keskmine vool (ca 14 pA). b) Tooniline aktivatsioon, mille keskmine vool on ca 43 pA. Rohkem kui 75% ionide voolust oli tekitatud toonilise aktivatsiooni poolt. Mõõtmised on teostatud hiire hipokampuse CA1 piirkonna püramidaalneuronitel (Mody ja Pearce, 2004 järgi).

Tooniline aktivatsioon on oluline, sest siis ekstrasünaptiliselt paiknevad retseptorid võivad vastu võtta mitte ainult sünaptilises pilus, aga ka ekstrasünaptiliselt liikuvaid molekule, mõjutades sellega raku metabolismi. Selliste retseptoritega neuronid paiknevad ajukoos, väikeajus, hipokampuses, talamuses ning seljaajus (Glykys ja Mody, 2007). Need andmed korreleeruvad etanooli toime eest vastutavate piirkondadega – väikeaju (motoorika efektid), hipokampus (amnestilised efektid) ja talamus (sedatiivsed ja anesteetilised efektid) (Wallner jt., 2003).

1.4 IgLON-valkude perekond

IgLON on immuunoglobuliinide superperekonda kuuluv närvirakkude adhesioonimolekulide perekond, mille valkude struktuuris on glükosüül-fosfatidüülinositol-ankur (GPI-ankur) (Pimenta jt., 1996) ning kolm immuunoglobulaarset domääni (Pimenta jt., 1995). GPI-ankur paigaldab neid molekule rakumembraanides paiknevatele liipidparvedele (Simons ja Toomre, 2000). IgLON-valgud on tugevalt glükosüleeritud (Itoh jt., 2008). Selle valguperekonna koosseisus on limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (ingl k. limbic system-associated membrane protein – LSAMP), opioide siduv raku adhesioonimolekul (ingl. k. opioid-binding cell adhesion molecule – OBCAM), neurotrimiin (ingl k. human neurotrimin – HNT, hiires - Ntm) ja NEGR-1 (ingl k. - neuronal growth factor-1) (Fumatsu jt., 1999;

Lodge jt., 2000). IgLON-itel on erinevad funktsioonid – neuriitide väljakasvu suunamine, rakk-rakk interaktsioonide reguleerimine ja äratundmine ning samuti on nad teatud kasvajatüüpide puhul tuumorsupressorid (Ntougkos jt., 2005). Need valgud on võimelised dimeriseeruma ning toimivad heterodimeeridena, mida nimetatakse digloniteks (McNamee jt., 2011). Käesolevas töös on põhirõhk LSAMP-valgul.

1.4.1 LSAMP

LSAMP on IgLON-i valkude perekonda kuuluv transmembraanne valk, mida sünteesitakse *lsamp* geenilt. Inimese ja hiire LSAMP-valgu aminohappeline koostis kattub 99% ulatuses (Pimenta jt., 1996). Geeni piirkond sisaldab 11 eksonit, mis paiknevad 2,2 Mbp ulatuses. Nii pikaks muudab geeni intron kahe esimese eksoni (eksonid 1a ja 1b) vahel – selle suurus on 1,6 Mbp. Eksonitel 1a ja 1b on kaks eraldi promootorit (Pimenta ja Levitt, 2004) ning nende esinemismustrid on erinevad – promootor 1a on aktiivsem hipokampuses ja amügdala piirkonnas ning promootor 1b – talamuse ja sensoorsetes piirkondades (Philips jt., 2014). Kuigi LSAMP-valku esineb paljudes ajupiirkondades, on selle kontsentratsioon suurim limbilise süsteemiga seotud ajuosades (ees- ja vaheaaju) (Pimenta jt., 1996).

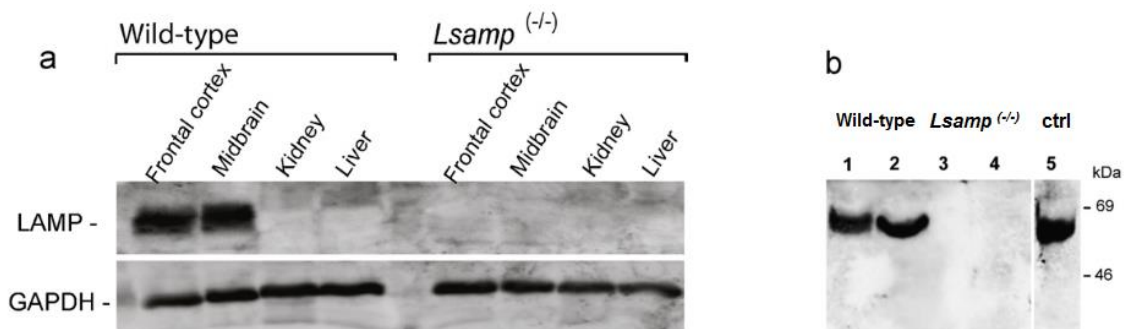
Rakukultuuri uuringud näitasid, et LSAMP-valk võib omada aksonite kasvu reguleerimise ja suunavat funktsiooni (Pimenta jt., 1995) ning toimida tuumorsupressorina (Pasic jt., 2010). On samuti näidatud, et heterofiilsed interaktsioonid Ntm-i ja LSAMP-i vahel on võimelised inhibeerima neuriitide väljakasvu (Gil jt., 2002).

Inimuuringutes on leitud seoseid LSAMP-valgu ning suitsiidi (Must jt., 2008) ja raske depressiivse häire (Koido jt., 2012) vahel, samuti oli selle valgu kontsentratsioon skisofreenia ja bipolaarse häirega patsientide post mortem frontaalkoores ca 20% suurenenud (Behan jt., 2008).

1.4.2 LSAMP-puudulikud hiireliinid

Esimene LSAMP-puudulik hiireliin valmistati Vanderbilti Ülikoolis (Nashville, Tennessee, USA) (Catania jt., 2008). See töögrupp asendas 100 nukleotiidi ekson 2 ja intron 2 kokkupuutekohas (sh. ka 3' splaissimiskohas). Tulemuseks oli *lsamp* geeni puudulik hiireliin (vt. joonis 4).

Teine LSAMP-puudulik hiireliin valmistati Tartu Ülikoolis (Innos jt., 2011). TÜ-s kasutatava hiireliini valmistamiseks asendati ekson 1b piirkonnas 4,6 kbp pikkune järjestus LacZ-NEO kassetiga. Tulemuseks oli *lsamp* geeni puudulik hiireliin (vt. joonis 4).



Joonis 4. a) Tartu Ülikoolis valmistatud LSAMP-puuduliku hiireliini Western blot. Metsiktüüpi hiirtes on LSAMP-valk olemas nii eesajukoores kui ka keskajus, kuid LSAMP-puudulikes hiirtes valk puudub. b) Catania jt. valmistatud LSAMP-puuduliku hiireliini Western blot. 1 ja 3 – ajukoorest, 2 ja 4 – hipokampusest võetud proovid. ctrl – kontroll (rekombinantne LSAMP-valk, molekulaarmass ca 68 kDa) (Innos jt., 2011 ja Catania jt., 2008 järgi).

LSAMP-puudulikud hiired on elujõulised, fertiilsed ning ilma silmapaistvate kõrvalekalleteta (Catania jt., 2008; Innos jt., 2011). Mõlemad töögrupid on näidanud, et need hiired on uutes keskkondades vähem ärevad ning nende uudishimu uut keskkonda uurida on võrreldes metsiktüüpi hiirtega suurem. Innos jt. (2011) poolt läbiviidud käitumiskatsete patarei näitas, et LSAMP^(-/-) hiired ei erine metsiktüüpi hiirtest motoorse võimekuse, lihasjõu, nägemise, kuulmise, haistmise ning somatosensoorse tundlikkuse poolest. Samas nad kaaluvad keskmiselt 10% vähem ja ujuvad aeglasemalt. Nende sotsiaalne käitumine on samuti erinev – nad on dominantsuskatsetes vähem agressiivsed ning neil ei esine vastastikust vurrude pügamist, mis viitab grupisisese tavapärase hierarhia puudumisele. GABA_A-retseptorite $\alpha 1$ ja $\alpha 2$ subühikud on nende hiirte ajudes samuti teistsuguse paiknemismustriga võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Innos jt., 2011). LSAMP-puudulike hiirte fenotüüp viitab kohanemisvõime langusele (Innos jt., 2012) ning need loomad on amfetamiini liikumisaktiivsust stimuleeriva toime suhtes vähem tundlikud, mis tuleneb tõenäoliselt serotoniini aktiivsemast metabolismist ja/või DA-transporteri vähenenud aktiivsusest ajus (Innos jt., 2013).

2 Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

LSAMP-puudulike hiirte ärevuskäitumine on metsiktüüpi hiirtest erinev. Bensodiasepiinid ja etanool mõjutavad imetajate ärevuskäitumist. Käesoleva töö eesmärgiks oli seostada need faktorid, uurides LSAMP-puudulike hiiri järgmiste farmakoloogiliste ja käitumuslike meetoditega:

- diasepaami, alprasolaami ja etanooli toimete uurimine tõstetud pluss-puuris ja liikumisaktiivsuse katses;
- püstumisreflekside kadumise ja taastumise latentsi mõõtmine vastusena diasepaami, alprasolaami ja etanooli suurele annusele;
- andmete statistiline analüüs ja interpreteerimine.

2.2 Materjalid ja meetodid

2.2.1 Katseloomad

Käesolevas töös kasutatud katseloomadeks olid Tartu Ülikoolis (arstiteaduskond, bio- ja siirdemeditiini instituut, füsioloogia osakond) loodud LSAMP-valgu puudulikkusega hiired (Innos jt., 2011). Kontrollgrupina kasutati metsiktüüpi pesakonnakaaslast. Kõik katsed tehti F2 põlvkonna hübriididega [(129S6/SvEvTac × C57BL/6) × (129S6/SvEvTac × C57BL/6)] vanuses 2-3 kuud. Loomad elasid standardsetes loomapuurides (42,5 × 26,6 × 15,5 cm), 8±1 looma puuris temperatuuril 22±1 °C 12 t/12 t valguse-pimeduse režiimil (tuled kustuvad kl 19:00). Toit ja vesi olid loomadele vabalt kättesaadavad. Puurides kasutati haavapuidust allapanu (2 cm kiht) ning haavapuidust pesamaterjali (0,5 l), mida vahetati iga nädal. Kõikide katsete teostamiseks oli loomkatse läbiviimise loakomisjoni luba.

2.2.2 Käitumiskatsed

Kõik käitumiskatsed viidi läbi kl 11:00 kuni 19:00. Loomad viidi katseruumi üks tund enne katset, et nad kohaneksid katseruumi tingimustega.

2.2.2.1 Tõstetud pluss-puur

Tõstetud pluss-puur kujutab endast neljast õlast koosnevat plussi kujulist platvormi, kus kaks paralleelselt paiknevat õlga on „suletud“ ehk 14 cm kõrgete seintega ning nendega perpendikulaarselt paiknevad õlad on avatud ehk ilma seinteta. Iga õla pikkus on 17,5 cm ning laius 5 cm. Platvorm on tõstetud 30 cm kõrgusele.

Tõstetud pluss-puur on levinud meetod näriliste ärevuse uurimiseks. Selle jaoks mõõdetakse erinevaid parameetreid nagu avatud ja suletud õlgadele sisenemiste arv, avatud õlgadel veedetud aeg sekundites, avatud ja suletud õlgade külastuskordade suhe, suletud õlast avatud õlale „piilumiste“ arv ehk riskihindamiskäitumine ning suletud ja avatud õlgadelt allavaatamiste arv.

Käesolevas töös asetati katseloom platvormi keskele näoga suletud õla suunas ning filmiti teda 5 minuti jooksul. Avatud õlale sisenemiseks loeti hetk, millal loom astus kõigi nelja käpaga avatud platvormile. Pärast iga looma puhastati katseseade etanoolilahuse ja lapiga ning kuivatati.

Loomade käitumist hindas video põhjal kogenud spetsialist.

2.2.2.2 Püstumisrefleksi kadumine ja taastumine

Püstumisrefleks on paljudele imetajatele omane refleks, mis taastab keha loomuliku orientatsiooni. Hiirte puhul see toimub siis, kui looma asetatakse selili.

Püstumisrefleksi kadumine (ingl. k – loss of righting reflex ehk LORR) ning püstumisrefleksi taastumine (ingl. k – regain of righting reflex ehk RORR) on farmakoloogilistes uuringutes kasutatavad käitumiskatsed, mis näitavad, kui kiiresti loomal ühe või teise sedatiivse või hüpnootilise toimega aine mõju all püstumisrefleks kaob (LORR) ning taastub (RORR).

Käesolevas töös kasutati kartongist valmistatud V-kujulisi aluseid, mis seisis püsti tänu külgede all olevatele tugidele. Püstumisrefleksi minetanud hiir pandi V-kujulise platvormi põhja selili.

LORR-i aeg kujutab endast aega aine süstimise ja püstumisrefleksi kadumise vahel (ehk mõõdetakse, kui palju aega kulub pärast süsti hetkeni, millal looma saab asetada selili nii, et tema ei ajaks ennast enam püsti). RORR-i aeg fikseeritakse siis, kui hiir keerab

ennast kolme minuti jooksul kolm korda püsti (ehk ajani, millal loom ajab ennast püsti ning teda ei õnnestu enam pikali panna). RORR-i mõõdetakse alates LORR-i hetkest.

2.2.2.3 Liikumisaktiivsuse katse

Hiirte liikumisaktiivsust mõõdeti helikindlates pleksiklaasist kastides (ingl. k – motility box) mõõtmetega $44,8 \times 44,8 \times 45$ cm. Iga kast oli ühendatud arvutiga, kus spetsiaalse programmi abil on võimalik mõõta hiire poolt läbitud teepikkust, tagakäppadele tõusmiste arvu, nurkade külastusi ning kasti keskel veedetud aega ja seal läbitud teepikkust.

2.2.3 Ainete manustamine

Käesolevas töös kasutati kahte bensodiasepiini (diasepaam ja alprasolaam) ning etanooli. Kõik ained lahustati füsioloogilises lahuses (0,9% naatriumkloriid); kontroll-lahusena kasutati füsioloogilist lahust. Kõigi ainete kõigi annuste puhul süstiti lahust 10 ml/kg kõhuõõnde ehk intraperitoneaalselt (i.p.). Ainete mõjuajaks oli tõstetud pluss-puuri ja liikumisaktiivsuse katsetes diasepaami ja alprasolaami puhul 30 minutit, etanooli puhul 20 minutit. LORR-i/RORR-i katses hakati latentsi mõõtma alates süstimisest.

2.2.4 Statistiline analüüs

Statistiline analüüs viidi läbi Windows Statistica 8.0 programmis.

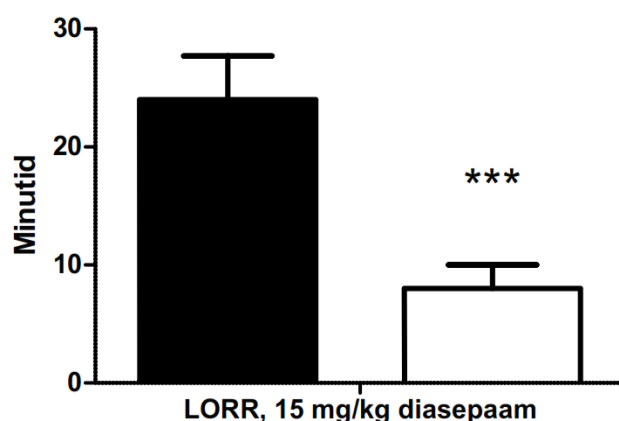
LORR-i/RORR-i katsetes, kus kasutati ühte toimeaine doosi, võrreldi grupe Studenti T-testiga. Pluss-puuri ja liikumisaktiivsuse katses, kus kasutati mitut annust, analüüsiti andmeid kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga (*two-way ANOVA*) (genotüüp \times doos). Post hoc testina kasutati Tukey HSD testi. Statistiliselt oluliseks loeti p-väärtust alla 0,05.

2.3 Tulemused

Käesoleva magistritöö tulemused on jaotatud kolme gruppi – katsed diasepaami, alprasolaami ja etanooliga. Tulemused on esitatud kujul keskmine \pm SEM (keskmise standardviga).

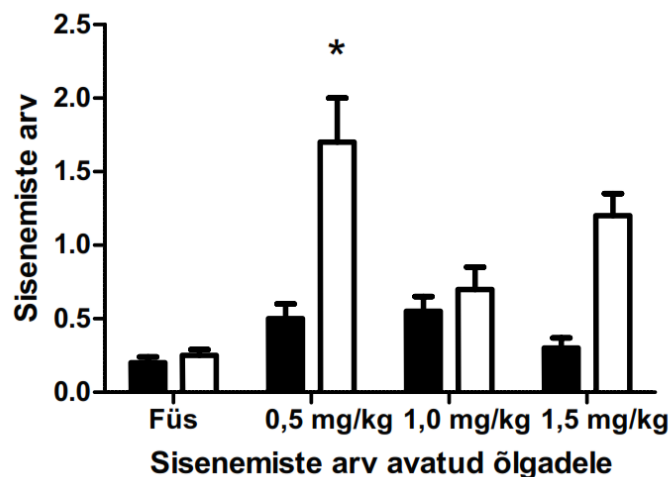
2.3.1 Katsed diasepaamiga

LORR-i/RORR-i-katses süstiti hiirtele 15 mg/kg diasepaami. LSAMP-puudulike hiirte püstumisrefleksi kadumise aeg ehk LORR oli oluliselt lühem ($F(1,27) = 14,1$; $p < 0,001$) (vt. joonis 5). Uuritavad hiired magasid mõnevõrra kauem (215 min), kui metsiktüüpi loomad (168 min), kuid RORR-i osas ei olnud vahe statistiliselt erinev ($F(1,27) = 1,75$; $p = 0,2$). Seega, LSAMP-puudulikes hiirtes on diasepaami toime avaldumine, ehk selle aine imendumine ja/või töötlus maksaensüümide poolt palju kiirem.



*Joonis 5. LORR diasepaami 15 mg/kg annuse puhul. Must tulp – metsiktüüpi hiired; valge tulp – LSAMP-puudulikud hiired. $N = 16$ mõlemas grupis. *** $p < 0,001$*

Tõstetud pluss-puuri katses ilmnes avatud õlgadele sisenemiste arvu osas oluline genotüübi efekt ($F(1,39) = 3,88$; $p < 0,05$). Diasepaami annus 0,5 mg/kg tõstis oluliselt ($p < 0,05$) ainult LSAMP-puudulike hiirte avatud õlgadele sisenemiste arvu võrreldes füsioloogilist lahust saanud grupiga (vt. joonis 6). Suurenenud avatud õlgadele sisenemiste arv on oluline vähenenud ärevuse näitaja. Seega, sellest katsest ilmneb, et LSAMP-puudulikud hiired on diasepaami anksiolüütilise (0,5 mg/kg) toime suhtes ülitundlikud. Suuremate annuste (1 ja 1,5 mg/kg) puhul lisandus ilmselt anksiolüütilisele toimele sedatiivne mõju, mis hakkas liikumisaktiivsust, sealhulgas avatud õlgadele sisenemist, pärssima.



Joonis 6. Keskmine avatud õlgadele sisenemiste arv diasepaami erinevate annuste puhul. Mustad tulbad – metsiktüüpi hiired; valged tulbad – LSAMP-puudulikud hiired. Füs – füsioloogiline lahus. $N=8$ igas genotüüp \times annus grupis. * $p < 0,05$ võrreldes füsioloogilist lahust saanud grupiga.

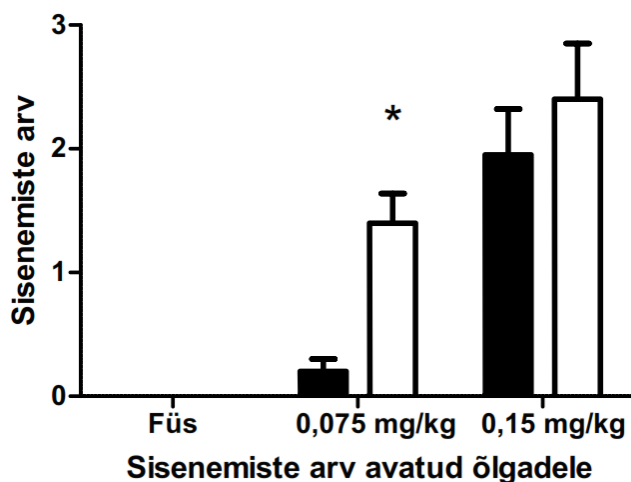
Liikumisaktiivsuse katses diasepaami erinevate annustega (füsioloogiline lahus ning 0,5, 1 ja 1,5 mg/kg diasepaami) ei ilmnenud statistiliselt olulisi erinevusi ühegi mõõdetud parameetri (läbitud distants, nurkade külastuste arv, püstumiste arv, keskel oldud aeg ja keskel läbitud distants) osas. Katse näitab, et diasepaam ei mõjuta LSAMP-puudulike ja metsiktüüpi hiirte liikumisaktiivsust erinevalt ning seega liikumisaktiivsus ei mõjuta pluss-puuris mõõdetud ärevuse parameetreid.

2.3.2 Katsed alprasolaamiga

Pilootkatses alprasolaamiga ($N = 6$ mõlemas grupis, kasutatud doos – 3 mg/kg) ei ilmnenud LORR-i osas gruppide vahel erinevusi (metsiktüüpi hiired uinusid keskmiselt 10,3 ja LSAMP-puudulikud hiired 10,9 min möödudes; $F(1, 10) = 0,35$; $p = 0,86$), kuid ärkamiseks (RORR) kulus LSAMP-puudulikel hiirtel (131 min) oluliselt kauem aega kui metsiktüüpi hiirtel (70 min) ($F(1, 10) = 5,14$; $p < 0,05$). Seega ilmnes pilootkatses LSAMP-puudulikel hiirtel alprasolaami hüpnootilise annuse suhtes ülitundlikkus, kuid ainult RORR-i osas, mitte aga LORR-i osas, nagu diasepaami puhul. Katset on vaja korrata suurema grupiga, mis teeks andmed usaldusväärsemaks.

Tõstetud pluss-puuri katses ilmnes avatud õlgadele sisenemiste arvu osas oluline genotüübi efekt ($F(1,27) = 3,42$; $p < 0,05$). Alprasolaami annus 0,075 mg/kg tõstis oluliselt ($p < 0,05$) LSAMP-puudulike hiirte, kuid mitte metsiktüüpi hiirte avatud õlgadele sisenemiste

arvu võrreldes füsioloogilist lahust saanud grupiga (vt. joonis 7). Teiste parameetrite osas statistilisi erinevusi ei ilmnenu.

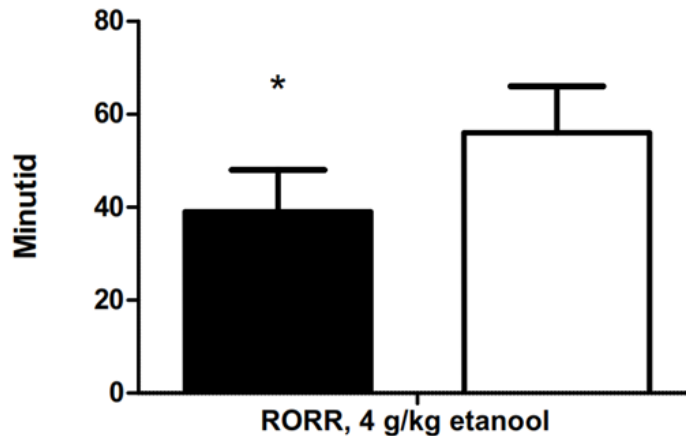


Joonis 7. Keskmise avatud õlgadele sisenemiste arv alprasolaami erinevate annuste puhul. Mustad tulbad – metsiktüüpi hiired; valged tulbad – LSAMP-puudulikud hiired. Füs – füsioloogiline lahust. $N=7-8$ igas genotüüp \times doos grupis. * $p < 0,05$ võrreldes füsioloogilise lahusega.

Liikumisaktiivsuse katse alprasolaami samade annustega näitas, et see aine ei oma statistiliselt erinevat mõju LSAMP-puudulikel ja metsiktüüpi hiirtel ühegi mõõdetud parameetri osas.

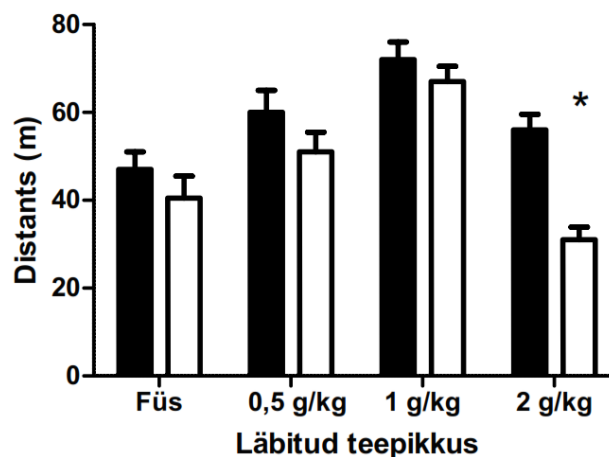
2.3.3 Katsed etanooliga

Etanooli annus 4 g/kg viis mõlemas grupis püstumisrefleksi kadumiseni (LORR) keskmiselt 2,5 minuti jooksul ($F(1,25) = 0,026$; $p = 0,87$), kuid taastumisaeg (RORR) oli mutantidel tunduvalt pikem ($F(1,26) = 3,46$; $p < 0,05$), mis võib viidata etanooli metabolismi kiiruse vähenemisele uuritavas hiireliinis (vt. joonis 8).



Joonis 8. RORR 4 g/kg etanooli annuse korral. Must tulp – metsiktüüpi hiired; valge tulp – LSAMP-puudulikud hiired. $N=13-14$. * $p < 0,05$

Liikumisaktiivsuse katses ilmnas läbitud distant si puhul statistiliselt oluline genotüübiefekt ($F(1, 85) = 7,04$; $p < 0,01$). Annuseni 1 g/kg avaldas etanool mõlemale genotüübile mõõdukat stimuleerivat toimet, kuid annusel 2 g/kg oli LSAMP-puudulikele hiirtele, kuid mitte metsiktüüpi hiirtele, tugev sedatiivne ehk liikumisaktiivsust pärssiv toime (vt. joonis 9). See tähendab, et LSAMP-puudulikud hiired vajavad madalamat etanooli doosi selleks, et esile tuleks aine sedatiivne toime.



Joonis 9. Liikumiskatses üldine läbitud teepikkus etanooli puhul. Mustad tulbad – metsiktüüpi hiired; valged tulbad – LSAMP-puudulikud hiired. Füs – füsioloogiline lahus. $N=7-8$ igas genotüüp \times doos grupis. * $p < 0,05$ vs 1 g/kg.

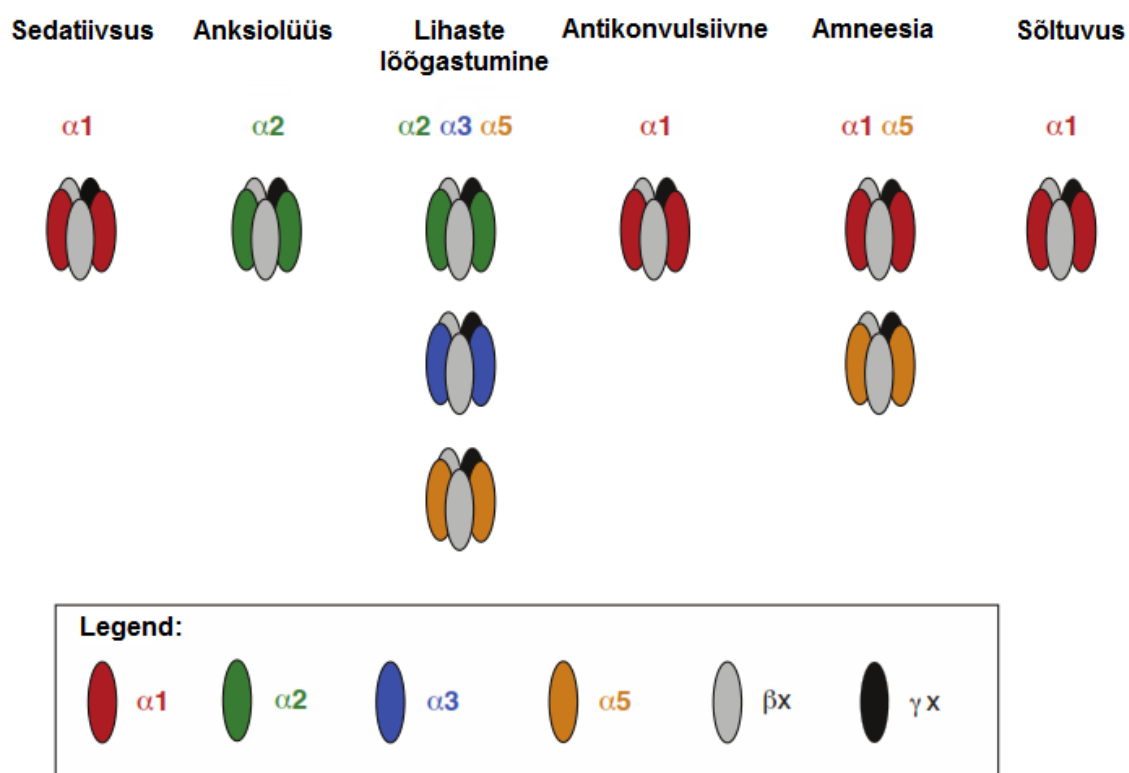
Tõstetud pluss-puuri katses etanooliga genotüüpide vahel ühegi parameetri osas statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenu.

2.4 Arutelu

Seoses bensodiasepiinide ja etanooli suure sõltuvusttekitava potentsiaali ja sellega kaasnenud probleemide suurenemisega on nende ühendite farmakoloogiline uurimine viimastel aastakümnetel muutunud aktiivsemaks.

Käesoleva magistritöö tulemused panustavad nii bensodiasepiinide ja etanooli kui ka LSAMP-valgu teadusesse, luues nende kahe teema vahele seoseid.

Uurides sõltuvust bensodiasepiinidest, Tan jt. (2011) tegid järelduse, et enamus bensodiasepiinide kliiniliselt olulistest efektidest on juba jaotatud subühikute vahel (vt. joonis 10).



Joonis 10. Rohketest bensodiasepiinide subühikute uuringutest selgus, et nt. bensodiasepiinide sedatiivse toime eest vastutavad $\alpha 1$ -subühikuid sisaldavad $GABA_A$ -retseptorid, anksiolüütilise toime eest – $\alpha 2$ -subühikuid sisaldavad jne. (Tan jt., 2011 järgi).

Tuginedes antud joonisele on võimalik osaliselt seletada ka käesoleva töö tulemusi.

Joonises 6 ja 7 on selgelt näha statistiline erinevus LSAMP-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel keskmise avatud õlgadele sisenemiste arvu puhul tõstetud pluss-puuri

katses. Avatud õlale sisenemine on parameeter, mis näitab hiire ärevuse taset ehk mida ärevam on hiir, seda vähem tekib loomal huvi avarat keskkonda uurida. Bensodiasepiinide anksiolüütiline toime muudab seda näitajat, mistõttu teen järelduse, et LSAMP-puudulikus hiireliinis on häiritud $\alpha 2$ -subühikuid sisaldavate GABA_A-retseptorite paiknemine ja/või kontsentratsioon. Selle kontrollimiseks on vaja uurida LSAMP-puudulike hiirte ajus $\alpha 2$ -subühikuid sisaldavate GABA_A-retseptorite paiknemist ja kontsentratsiooni ärevuse eest vastutavates ajupiirkondades ning kontrollida ka bensodiasepiinide lihaseid lõdvestavat toimet.

Jooniselt 10 on näha, et bensodiasepiinide sedatiivse toime eest vastutavad $\alpha 1$ -subühikuid sisaldavad GABA_A-retseptorid. Joonisel 5 on näha, et diasepaami sedatiivne efekt on LSAMP-puudulikel hiirtel võimendunud. Loogiline järeldus oleks, et LSAMP-puudulikel hiirtel on $\alpha 1$ -subühikuid sisaldavate GABA_A-retseptorite kontsentratsiooni ja/või paiknemise hälved. Samas on $\alpha 1$ -subühikuid sisaldavad GABA_A-retseptorid olulised ka bensodiasepiinide antikongvulsiivse, amnestilise ja sõltuvusttekitava toime juures, mistõttu on oluline uurida LSAMP^(-/-)-hiirtes ka bensodiasepiinide nende toimete tugevust.

Etanooliga katsete tulemusi on selle töö kontekstis raskem interpreteerida seoses sellega, et kasutatud etanooli kontsentratsioonide juures on aktiivsed väga mitmed GABA_A-retseptorite tüübid. Tulemuste täpsemaks interpreteerimiseks võiks uurida LSAMP-puudulike hiirte käitumist $\alpha 4\beta 3\delta$ ning $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A-retseptorite agonisti/antagonisti olemasolul ja vaadata ka vastavate retseptorite paiknemist ja kontsentratsiooni hiirte talamuses ja väikeajus.

Oluline on meeles pidada, et IgLON-perekonna valgud toimivad dimeeride ehk diglonitena. Meie laboris kasutuses olev hiireliin on defektne ainult LSAMP-valgu suhtes, mis terves organismis teeb koostööd ka teiste valkudega (nt. neurotrimiin). Kõikide katsete juures peab silmas pidama, et mängus võivad olla kompensatsioonimehhanismid, mis aitavad organismil vajaliku valgu puudumisel võimalikult normaalselt funktsioneerida. On võimalik, et paljudes kohtades, kus pidi olema LSAMP-valk, on selle asemel mingi teine IgLON, mis funktsioneerib sarnaselt. Selle võimaluse vältimiseks ning LSAMP-valgu funktsiooni täpsemaks selgitamiseks peab uurima kaksik-mutante, ehk transgeenseid hiiri, kelles on puudu kaks IgLON-valku, võrreldes neid tulemusi üksikmutantidega saadud tulemustega. Samuti tuleks mõõta teiste IgLON-ite mRNA ja valgu taset ühe IgLON-i puudumisel.

Järgmiseks sammuks on psühhotroopsete ainete uurimine *ntm/lsamp*-kaksik-mutantides ning tulemuste võrdlemine üksikmutantidega tehtud katsete tulemustega. Paralleelselt alustame/jätkame GABA_A-retseptorite erinevate subühikute agonistide/antagonistide toimete uuringuid LSAMP- ja Ntm-puudulikes hiirtes.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida LSAMP-puudulike hiirte tundlikkust diasepaami, alprasolaami ja etanooli suhtes, kasutades farmakoloogilisi ja käitumuslikke meetodeid.

Varasemad andmed näitasid, et LSAMP-puudulikud hiired on vähem tundlikud uues keskkonnas tekkiva stressi suhtes. Nende loomade käitumine on vähem inhibeeritud, ent samas vähem agressiivne (Innos jt., 2011; 2012).

Bensodiasepiinid on populaarsemad ärevusvastased retseptiravimid maailmas, tihti aga kasutatakse samal otstarbel ka alkohoolseid jooke. Mõlemate ainete kasutamine võib kergesti viia tervisliku seisundi halvenemise ja sõltuvuseni.

Läbiviidud katsed näitavad, et LSAMP-valgul on kindlasti oluline roll GABA_A-retseptorite mõnede funktsioonide talitluse regulatsioonis.

Katsed diasepaamiga näitasid statistiliselt olulist erinevust loomade LORR-i puhul, ehk LSAMP-puudulikud hiired jäid võrreldes metsiktüüpi hiirtega oluliselt kiiremini magama. Katsed tõstetud pluss-puuris näitasid, et 0,5 mg/kg diasepaami doosi korral liikusid loomad keskmiselt 3 korda aktiivsemalt avatud õlale võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Sisenemine avatud õlale on oluline vähenenud ärevuse näitaja.

Katsed alprasolaamiga näitasid suurt statistilist erinevust tõstetud pluss-puuris keskmise avatud õlgadele sisenemiste arvu puhul 0,075 mg/kg doosi korral, mis samuti näitab, et LSAMP-puudulikud hiired on juba väikestele alprasolaami annustele väga tundlikud. Suuremate dooside korral hakkab ilmselt domineerima aine lihaseid lõdvestav ja/või sedatiivne toime. Pilootkatse põhjal olid LSAMP-puudulikud hiired ka alprasolaami sedatiivsele toimele tundlikumad, sest magasid alprasolaami sedatiivse doosi toimetel metsiktüüpi hiirtest oluliselt kauem, kuid see katse kindlasti vajab kordamist.

Katsed etanooliga näitasid statistiliselt olulist erinevust loomade RORR-i puhul (annus – 4 g/kg), ehk LSAMP-puudulikud hiired magasid metsiktüüpi hiirtega võrreldes pikemat aega. Liikumisaktiivsuse katses ilmnes statistiliselt oluline erinevus läbitud teepikkuses 2 g/kg etanooli doosi korral – LSAMP-puudulikud hiired liikusid võrreldes

metsiktüüpi hiirtega keskmiselt vähem, mis viitab sellele, et etanooli suurematel annustel on mutantides tugevam sedatiivne toime.

Edaspidi on vajalik uurida LSAMP-puudulike hiirte GABAergilist süsteemi lähemalt, kasutades spetsiifilisi GABA_A-retseptori subühikute ligande. On samuti oluline korrata vastavaid katseid *ntm/lsamp*-kaksik-mutantidega ehk hiirtega, kelle organismis puuduvad korraga nii Ntm kui ka LSAMP-valk. Kogu see töö võib anda võimalusi uute GABA_A-retseptoritele seonduvate farmakonide disainimiseks, mille toimiv annus ja ühtlasi ka sõltuvust tekitav potentsiaal oleksid väiksemad kui praegu kasutatavatel bensodiasepiinidel.

LSAMP deficit-induced hypersensitivity to benzodiazepines and ethanol in mice

Aleksandr Bregin

SUMMARY

One of the most prominent problems of the modern world is stress and the anxiety, depression and lifestyle changes it induces. People battle stress in many different ways, some find their way out and some do not. The weaker people turn to street drugs and alcoholic drinks, the braver ones find stress-reducing hobbies or visit the doctor, who can provide clinical help from anti-depressants and anxiolytics to complex medical care in more difficult cases. The most popular anxiolytic drugs are benzodiazepines – diazepam (Valium) and alprazolam (Xanax), which may easily induce dependence. Both ethanol and benzodiazepines are easily abusable, which makes both of these substances an important topic for scientists to study.

It has been shown that the benzodiazepines and ethanol act through the GABAergic system in mammals. They bind to the GABA_A-receptors in the brain, whose ligands are known to have anxiolytic, amnesic, anticonvulsant, sedative and many other properties.

The limbic system-associated membrane protein (LSAMP) is a member of the IgLON-family of neural adhesion molecules and is found predominantly in the limbic system of the brain. The protein is 99% homologous between mouse and human. Its main function is axon guidance within specific areas of the brain. The University of Tartu has developed a LSAMP-deficient mouse line to study the protein and its clinical potential. LSAMP-deficient mice are less anxious in new environments, have less aggressive social behaviors and have been shown to have deviations in the GABAergic system.

The aim of this study was to combine knowledge of the neuropharmacology of diazepam, alprazolam and ethanol with the knowledge of the LSAMP-protein and show that the sensitivity of the LSAMP-deficient mouse line to two of the most popular benzodiazepines and ethanol by using pharmacological and behavioral methods. Loss/regain of righting reflex, elevated plus-maze and locomotor activity experiments were conducted with LSAMP-deficient and wild type mice.

The experiments with diazepam showed significant difference between the LSAMP-deficient and wild type mice in the loss of righting reflex (LORR) assay after being intraperitoneally (i.p.) injected with 15 mg/kg diazepam. LSAMP-deficient mice had a quicker onset of diazepam actions. The elevated plus-maze assay also showed a significant difference between the two lines after an i.p. injection of 0,5 mg/kg diazepam in the average number of open arm entries. The LSAMP-deficient mice were more hesitant to explore the open arms of the plus-maze than their wild type littermates.

The experiments with alprazolam showed a significant difference between the two genotypes in the average number of open arm entries during the elevated plus-maze assay after an i.p. injection of 0,075 mg/kg of the substance. The LSAMP-deficient mice explored the open arms more often. A pilot-study also showed that the sedative action of alprazolam (dose – 3 mg/kg) is more prominent in the studied mouse line – the transgenic mice had a significantly longer regain of righting reflex (RORR) compared to the wild type mice, though this experiment should be repeated with a larger group.

The experiments with ethanol showed a significant difference between the two mouse lines in the regain of righting reflex (RORR) assay with the LSAMP-deficient mice having the longer time after an i.p. injection of 4 g/kg ethanol. There was also a significant difference in the locomotor activity test, where after an i.p. injection of 2 g/kg the LSAMP-deficient mice moved less compared with their wild type littermates.

All these results suggest that the LSAMP-deficient mice are hypersensitive to specific actions of the two most popular benzodiazepines and ethanol. Both diazepam and alprazolam have a more prominent sedative and anxiolytic effect in the studied mouse-line. Ethanol shows a stronger sedative action and slower metabolism in LSAMP-deficient mice.

Previous studies have linked specific GABA_A-receptor subunits with specific benzodiazepine actions. With this knowledge it is now possible to study the GABAergic system of LSAMP-deficient in more detail.

It is important to keep in mind that the IgLON proteins work as dimers. This means that the LSAMP-deficient mouse line most probably has active compensation mechanisms, where in the absence of one IgLON protein another one takes its place to stabilize the organism.

To take the most out of this work it is important to conduct parallel studies in double-mutants (double-knockout mice who simultaneously lack a functional *ntm* and *lsamp* gene, for instance) and single-gene mutants. Comparing these results will be most useful.

The future of this project lies on studying the effects of psychoactive drugs (including agonists/antagonists of specific types of GABA_A-receptors) in the LSAMP-, Ntm- and LSAMP/Ntm-deficient mice and the comparison of the results.

Kasutatud kirjandus

1. Ashton, H. (1994). Guidelines for the Rational Use of Benzodiazepines. *Drugs*, 48(1), 25-40.
2. Baraona, E., Abittan, C. S., Dohmen, K., Moretti, M., Pozzato, G., Chayes, Z. W., et al. (2001). Gender Differences In Pharmacokinetics Of Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(4), 502-507.
3. Behan, A. (2008). Proteomic Analysis Of Membrane Microdomain-Associated Proteins In The Dorsolateral Prefrontal Cortex In Schizophrenia And Bipolar Disorder Reveals Alterations In Lamp, Stxbp1 And B. *Schizophrenia Research*, 102(1-3), 219.
4. Bernier, B. E., Whitaker, L. R., & Morikawa, H. (2011). Previous Ethanol Experience Enhances Synaptic Plasticity of NMDA Receptors in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neuroscience*, 31(14), 5205-5212.
5. Catania, E., Pimenta, A., & Levitt, P. (2008). Genetic Deletion of Lsamp Causes Exaggerated Behavioral Activation in Novel Environments. *Behavioural Brain Research*, 188, 380-390.
6. Costa, V. D., Lang, P. J., Sabatinelli, D., Versace, F., & Bradley, M. M. (2010). Emotional imagery: Assessing pleasure and arousal in the brain's reward circuitry. *Human Brain Mapping*, 31(9), 1446-1457.
7. Crabbe, J. C., Phillips, T. J., Harris, R. A., Arends, M. A., & Koob, G. F. (2006). Alcohol-related Genes: Contributions From Studies With Genetically Engineered Mice. *Addiction Biology*, 11(3-4), 195-269.
8. Garcia-Gutierrez, M. S., & Manzanares, J. (2010). The cannabinoid CB1 receptor is involved in the anxiolytic, sedative and amnesic actions of benzodiazepines. *Journal of Psychopharmacology*, 24(5), 757-765.
9. Gil, O. D., Zhang, L., Chen, S., Ren, Y., Pimenta, A., Zanazzi, G., et al. (2002). Complementary expression and heterophilic interactions between igLON family members neurotrimin and LAMP. *Journal of Neurobiology*, 51(3), 190-204.
10. Glykys, J., & Mody, I. (2007). Activation of GABA_A Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft. *Neuron*, 56(5), 763-770.
11. Golden, S. A., & Russo, S. J. (2012). Mechanisms of Psychostimulant-Induced Structural Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a011957-a011957.

12. Hanchar, H. J., Wallner, M., & Olsen, R. W. (2004). Alcohol effects on γ -aminobutyric acid type A receptors: are extrasynaptic receptors the answer?. *Life Sciences*, 76(1), 1-8.
13. Harris, R. A., Trudell, J. R., & Mihic, S. J. (2008). Ethanol's Molecular Targets. *Science Signaling*, 1(28), re7-re7.
14. Innos, J., Kõks, S., Heinla, I., Leidmaa, E., Philips, M., Vasar, E., et al. (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in Lsamp-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 21-31.
15. Innos, J., Philips, M., Raud, S., Lilleväli, K., Kõks, S., & Vasar, E. (2012). Deletion of the Lsamp gene lowers sensitivity to stressful environmental manipulations in mice. *Behavioural Brain Research*, 228(1), 74-81.
16. Innos, J., Leidmaa, E., Philips, M., Sütt, S., Alttoa, A., Harro, J., et al. (2013). Lsamp^{-/-} mice display lower sensitivity to amphetamine and have elevated 5-HT turnover. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 413-418.
17. Itoh, S., Hachisuka, A., Kawasaki, N., Hashii, N., Teshima, R., Hayakawa, T., et al. (2008). Glycosylation Analysis of IgLON Family Proteins in Rat Brain by Liquid Chromatography and Multiple-Stage Mass Spectrometry. *Biochemistry*, 47(38), 10132-10154.
18. Kittler, J. T., & Moss, S. J. (2003). Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3), 341-347.
19. Koido, K., Vasar, V., Vasar, E., Shlik, J., Tõru, I., Maron, E., et al. (2012). Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Translational Psychiatry*, 2(8), e152.
20. Lalive, A., Rudolph, U., Lücher, C., & Tan, K. (2011). Is there a way to curb benzodiazepine addiction?. *Swiss Medical Weekly*, 141, w13277.
21. Levitt, P. (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*, 223(4633), 299-301.
22. Lodge, A. P., Howard, M. R., Mcnamee, C. J., & Moss, D. J. (2000). Co-localisation, heterophilic interactions and regulated expression of IgLON family proteins in the chick nervous system. *Molecular Brain Research*, 82(1-2), 84-94.
23. Makkar, S. R., Zhang, S. Q., & Cranney, J. (2010). Behavioral and Neural Analysis of GABA in the Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Fear

Memory. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1625-1652.

24. McNamee, C. J., Youssef, S., & Moss, D. (2011). IgLONs form heterodimeric complexes on forebrain neurons. *Cell Biochemistry and Function*, 29(2), 114-119.
25. Mody, I., & Pearce, R. A. (2004). Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. *Trends in Neurosciences*, 27(9), 569-575.
26. Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., et al. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Medical Genetics*, 9(1), 34.
27. Ntougkos, E. (2005). The IgLON Family in Epithelial Ovarian Cancer: Expression Profiles and Clinicopathologic Correlates. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5764-5768.
28. Olsen, R., Li, G., Wallner, M., Trudell, J., Bertaccini, E., Lindahl, E., et al. (2014). Structural models of ligand-gated ion channels: sites of action for anesthetics and ethanol.. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38, 595-603.
29. Olsen, R. W., Chang, C. S., Li, G., Hanchar, H. J., & Wallner, M. (2004). Fishing for allosteric sites on GABAA receptors. *Biochemical Pharmacology*, 68(8), 1675-1684.
30. Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2009). GABA_A receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 141-148.
31. O'Leary-Moore, S. K., Parnell, S. E., Lipinski, R. J., & Sulik, K. K. (2011). Magnetic Resonance-Based Imaging in Animal Models of Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Neuropsychology Review*, 21(2), 167-185.
32. Pasic, I., Shlien, A., Durbin, A. D., Stavropoulos, D. J., Baskin, B., Ray, P. N., et al. (2010). Recurrent Focal Copy-Number Changes and Loss of Heterozygosity Implicate Two Noncoding RNAs and One Tumor Suppressor Gene at Chromosome 3q13.31 in Osteosarcoma. *Cancer Research*, 70(1), 160-171.
33. Peng, G., Wang, M., Chen, C., Luu, S., Choi, H., Li, T., et al. (1999). Involvement of acetaldehyde for full protection against alcoholism by homozygosity of the variant allele of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene in Asians.. *Pharmacogenetics*, 9, 463-476.
34. Philips, M., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C., Kongi, K., et al. (2014). Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain structure & function*, e-publication.
35. Phillips, P. E., Walton, M. E., & Jhou, T. C. (2007). Calculating utility: preclinical

- evidence for cost-benefit analysis by mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology*, 191(3), 483-495.
36. Pimenta, A. F., & Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (Lsamp) gene. *Genomics*, 83(5), 790-801.
 37. Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe, M. F., Reinoso, B. S., Grimley, C., Henzel, W., et al. (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron*, 15(2), 287-297.
 38. Pimenta, A. F., Reinoso, B. S., & Levitt, P. (1996). Expression of the mRNAs encoding the limbic system-associated membrane protein (LAMP): II fetal rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 375(2), 289-302.
 39. Pimenta, A. F., Fischer, I., & Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene*, 170(2), 189-195.
 40. Reynolds, L. M., Engin, E., Tantillo, G., Lau, H. M., Muschamp, J. W., Carlezon, W. A., et al. (2012). Differential Roles of GABA_A Receptor Subtypes in Benzodiazepine-Induced Enhancement of Brain-Stimulation Reward. *Neuropsychopharmacology*, 37(11), 2531-2540.
 41. Robinson, T. (2004). Structural Plasticity Associated With Exposure To Drugs Of Abuse. *Neuropharmacology*, 47, 33-46.
 42. Rudolph, U., & Mohler, H. (2006). GABA-based Therapeutic Approaches: GABA_A Receptor Subtype Functions. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 18-23.
 43. Rudolph, U., & Möhler, H. (2004). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics.. *Pharmacology and Toxicology - Annual Reviews*, 44, 475-498.
 44. Rudolph, U., Crestani, F., & Möhler, H. (2001). GABAA receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 188-194.
 45. Russo, S. J., Dietz, D. M., Dumitriu, D., Morrison, J. H., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2010). The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*, 33(6), 267-276.
 46. Schultz, W. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*, 275(5306), 1593-1599.

47. Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and Brain Functions*, 6(1), 24.
48. Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., & Silver, R. (2004). Tonic active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 262-269.
49. Shelmet, J. J., Reichard, G. A., Skutches, C. L., Hoeldtke, R. D., Owen, O. E., & Boden, G. (1988). Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance.. *Journal of Clinical Investigation*, 81(4), 1137-1145.
50. Shen, Y., Zhao, Z., Fan, J., Xia, G., Wang, J., Zhou, R., et al. (1997). Polymorphism of ADH and ALDH Genes among Four Ethnic Groups in China and Effects upon the Risk for Alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(7), 1272-1277.
51. Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 31-39.
52. Sklair-Tavron, L. (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 11202-11207.
53. Streissguth, A. P. (1991). Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 265(15), 1961-1967.
54. Tan, K. R., Brown, M., Labouebe, G., Yvon, C., Creton, C., Fritschy, J., et al. (2010). Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*, 463(7282), 769-774.
55. Tan, K. R., Rudolph, U., & Lüscher, C. (2011). Hooked on benzodiazepines: GABA_A receptor subtypes and addiction. *Trends in Neurosciences*, 34(4), 188-197.
56. Thomas, M. J., Kalivas, P. W., & Shaham, Y. (2008). Neuroplasticity In The Mesolimbic Dopamine System And Cocaine Addiction. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 327-342.
57. Treiman, D. M. (2001). GABAergic Mechanisms In Epilepsy. *Epilepsia*, 42(s3), 8-12.
58. Tyrer, P. (1989). Risks of dependence on benzodiazepine drugs.. *BMJ*, 298(6671), 456-457.
59. Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., & Addolorato, G. (2008). Acute Alcohol Intoxication. *European Journal of Internal Medicine*, 19(8), 561-567.
60. Wallner, M. (2003). From The Cover: Ethanol enhances $\alpha 4\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ -

aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(25), 15218-15223.

61. Wallner, M., Hancher, H. J., & Olsen, R. W. (2006). Low dose acute alcohol effects on GABA_A receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(2), 513-528.
62. Yoshimura, M., & Tabakoff, B. (2004). Selective effects of ethanol on the generation of cAMP by particular members of the adenylyl cyclase family.. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19, 1435-1440.

Kasutatud raamatud:

1. Coulson, C. J. (1994). *Molecular mechanisms of drug action* (2nd ed.). London: Taylor & Francis.
2. Dale, M. M., & Rang, H. P. (2007). *Rang & Dale's pharmacology* (6th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone.
3. Feldman, R., Meyer, J., & Quenzer, L. (1996). *Principles of Neuropharmacology*. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates.
4. Meyer, J. S., & Quenzer, L. F. (2005). *Psychopharmacology: drugs, the brain, and behavior*. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates, Publishers.
5. Salaspuro, M. (1998). *Päihdelääketiede*. Helsinki: Duodecim (Tõlkija: Heli Kõiv (2000); *Narkoloogia*. Tallinn: Medicina).
6. Schatzberg, A. F., & Nemeroff, C. B. (2004). *The American Psychiatric Publishing textbook of psychopharmacology* (3rd ed.). Washington, DC: American Psychiatric Pub.
7. Skoutakis, V. A. (1982). *Clinical toxicology of drugs: principles and practice*. Philadelphia: Lea & Febiger.

Kasutatud veebiaadressid:

1. <http://nida.nih.gov>

Tänuavaldused

Tänan oma juhendajaid – Jürgen Innost selle eest, et aktiivselt näitas ja juhendas mind käitumiskatsete ja hiireteaduse osas ning aitas parandada tööd oma ideede ja teadmistega. Aitäh Mari-Anne Philipsile ja Kersti Lilleväljale, kes andsid mulle võimaluse osaleda ka teistes teadusprojektides, laienedes minu silmaringi ja teadmisi. Tänan ka kõiki teisi, kes on aidanud mind selle magistritöö koostamisel, kirjutamisel ja parandamisel.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aleksandr Bregin, sünnikuupäev: 08.03.1989

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„LSAMP geeni puudulikkusest põhjustatud ülitundlikkus bensodiasepiinidele ja etanoolile hiirtel.“

mille juhendajad on Jürgen Innos, Mari-Anne Philips ja Kersti Lilleväli

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.23.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014